

Министерство образования и науки Российской Федерации
ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ
ОБРАЗОВАТЕЛЬНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ
«САРАТОВСКИЙ НАЦИОНАЛЬНЫЙ ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ
ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ ИМЕНИ Н.Г.
ЧЕРНЫШЕВСКОГО»

Кафедра биохимии и биофизики

**ВЛИЯНИЕ ФЛАВОИОИДОВ НА ЭЛЕКТРИЧЕСКИЕ ПОКАЗАТЕЛИ
КЛЕТОК АЗОСПИРИЛЛ**

АВТОРЕФЕРАТ БАКАЛАВРСКОЙ РАБОТЫ

Студентки 4 курса 422 группы

Направления подготовки бакалавриата 06.03.01 Биология

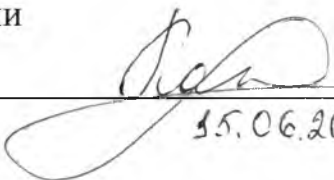
биологического факультета

Борисовой Светланы Владимировны

Научный руководитель:

Ассистент кафедры биохимии

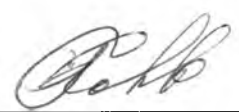
и биофизики, к.б.н.,


_____ 15.06.2017

М.В. Каневский

Зав. кафедрой биохимии и

биофизики, д.б.н., профессор


_____ 18.06.2017

С. А. Коннова

Саратов 2017

ВВЕДЕНИЕ.

Актуальность работы. Общеизвестно, что бактерии являются неотъемлемой частью жизни и развития растений. Прорастающее и развивающееся из семени в почве растение сталкивается с различными микроскопическими биологическими объектами. Корень контактирует как с симбиотическими, полезными для растения, бактериями, так и с патогенными бактериями-паразитами, взаимодействие с которыми приводит к болезни или гибели растения. В процессе жизнедеятельности растения синтезируют и выделяют в окружающую среду широкий спектр соединений: органические кислоты, в том числе и аминокислоты, моно- и полисахариды, а также вторичные метаболиты, которые играют важную роль в растительно-микробных взаимодействиях. Среди всего разнообразия веществ, выделяемых растением в ризосферу, особый интерес вызывают флавоноиды – соединения фенольной природы.

Флавоноиды выполняют широкий спектр функций в растениях: участвуют в окислительно-восстановительных реакциях, обеспечивают окрашивание лепестков и плодов, защищают растения от ультрафиолетового излучения и тяжёлых металлов. В настоящее время установлено, что флавоноиды являются аллелохимическими факторами: играют важную роль в процессах взаимодействия растений и микроорганизмов, растений и животных, а также растений между собой.

Проведённые ранее исследования симбиоза ризобий с корнями растений семейства *Fabaceae* показали, что присутствующие в экссудатах корней флавоноиды, обеспечивают специфичность пары растение-микроорганизм, приводят к необходимым для эффективного формирования клубенька изменениям состава и структуры гликополимеров поверхности бактерий. Аналогичные исследования проводились на бактериях рода *Azospirillum*, которые представляют собой модель для изучения ассоциативного симбиоза.

Однако в настоящее время практически неизученным остаётся вопрос

После 5 мин наблюдается снижение показателя на 32% и максимальное снижение до 10% на 30 мин.

Добавление палладия увеличивает токсические свойства пленок. Так число КОЕ снижается на 15-20% на каждом шаге для MSSA и достигает 13% при 30 минутах экспозиции. Для MRSA наблюдается снижение до 71% на 5 мин и далее снижается на 10-20% при увеличении времени. Минимум составляет 7% на 30 мин.

Образцы, содержащие палладий и азот показывают также высокие фотодинамические свойства для всех видов стафилококка. В частности, для MSSA уменьшение КОЕ до 75% на 0 мин и последующее уменьшение на 20-27% для каждого шага времени. Уже на 15 минутах КОЕ составляет 9% и ещё через 15 мин снижается до 5%. Для MRSA показатели тоже высоки. На каждом шаге времени снижение КОЕ составляет 10-27%. Максимум снижения составляет 13% для 30 мин.

3.1.2 Влияние светодиодного синего (405 нм) излучения и водного раствора астралена на выживаемость *S. aureus*

Анализ метициллин-чувствительных штаммов золотистого стафилококка после комбинированного воздействия комплекса синего света (405 нм) и суспензии астраленов показал следующие результаты (рисунок 2).

Данные контроля показывают последовательное незначительное снижение КОЕ на 2-10% на каждом шаге времени.

На 0 минутах воздействия наблюдается снижение КОЕ на 5%. Обработка клеток *S. aureus* астраленами значительно усиливала угнетающее действие светодиодного синего излучения. Далее, после 5 минут воздействия, КОЕ снижается на 10%.

Более длительное облучение (10 минут) дает большее снижение КОЕ. В итоге показатель упал до 72,4%.

влияния флавоноидов на состояние мембран клеток. В современной литературе присутствуют лишь единичные данные о физических и химических аспектах взаимодействия веществ флавонового ряда с компонентами оболочки клеток.

При оценке состояния мембран клеток, а также их жизнеспособности в целом наиболее удобным является такой параметр, как полное сопротивление – импеданс.

Исходя из вышесказанного, **цель** данной работы заключалась в изучении влияния флавоноидов на изменение электрических показателей клеток азоспирилл.

Для реализации поставленной цели в ходе исследования были поставлены и решались следующие **задачи**:

1. Изучить изменения электрических показателей клеток азоспирилл, выращенных в присутствии эффективных концентраций флавоноидов.

2. Оценить динамику изменений электрических показателей клеток азоспирилл при культивировании в присутствии эффективных концентраций разных флавоноидов в течении 10 минут, 1 часа, 24 часов.

3. Определить характер изменений электрических показателей клеток азоспирилл при выращивании в присутствии высоких и низких концентраций флавоноидов.

Структура бакалаврской работы. Выпускная квалификационная работа состоит из пяти частей: введения, основной части, заключения, выводов и списка использованных источников. Основная часть включает в себя три раздела: обзор литературы, материалы и методы исследования, результаты исследований. Раздел обзор литературы состоит из шести подразделов: общие сведения о флавоноидах и их классификация, функции флавоноидов, участие флавоноидов в ризосферных симбиозах, взаимодействие флавоноидов с клеточными мембранам, бактерии рода *Azospirillum* как модельный объект исследования растительно-микробных ассоциации,

импедансометрия как метод определения электропроводности мембран, коэффициент поляризации как показатель изменения электропроводности мембран. Раздел материалы и методы состоит из четырех подразделов: приборы и материалы, объекты исследования, условия культивирования микроорганизмов, метод импедансометрии. Раздел результаты исследований включает в себя три подраздела: исследование электрических свойств клеток азоспирилл, выращенных в присутствии флавоноидов; исследование динамики изменения импеданса клеток азоспирилл, выращенных в присутствии флавоноидов; изучение влияния концентрации флавоноидов в среде выращивания на изменение электрических показателей клеток азоспирилл.

Приборы и материалы. Для осаждения клеток использовались центрифуги Janetzki «Т-24» (Германия), Mini Spin (Eppendorf, Германия). Культивирование микроорганизмов проводили при постоянном перемешивании на орбитальном шейкере BioSan Ltd «PSU-10» (Латвия). Дисперсию импеданса изучали при помощи установки измерителя импеданса, состоящего из генератора сигналов Г6-27, цифрового вольтметра В7-27 А/1, блока питания К762 и измерительной кюветы (Россия). Прибор предназначен для измерения величины импеданса в диапазоне частот 5Гц — 1МГц. Измерение кислотности проводили с помощью рН-метра METTLER TOLEDO (Китай). Статистическая обработка фактического материала выполнена на ПЭВМ, с применением программы Microsoft[®] Excel 7.0, достоверность различий между средними значениями в контрольной и опытной группах устанавливали с помощью t- критерия Стьюдента.

Объекты исследования. В работе использовались следующие микроорганизмы: грамотрицательные микроорганизмы *A. brasilense* Sp245, *A. brasilense* Sp7 и *A. lipoferum* SR65, которые были любезно предоставлены коллекцией микроорганизмов ИБФРМ РАН (Саратов, Россия). Культивирование исследуемых микроорганизмов проводили в жидкой

модифицированной синтетической малатно-солевой среде, предложенной Доберейнер и Дэй. При помощи NaOH (40 г/л) реакцию среды доводили до pH 6.6-6.8. Непосредственно перед стерилизацией в среду добавляли 1 мл раствора витаминов на 1 л среды и раствор хелата железа из расчёта 10 мл на 1 л среды.

Флавоноиды растворяли в диметилформамиде (ДМФА) и добавляли в среду выращивания до внесения инокулята. Конечная концентрация ДМФА в среде не превышала 0.2%.

Метод импедансометрии. Оценку состояния биомембран проводили методом импедансометрии. Суспензия клеток вносится в измерительную кювету, через которую пропускается переменный ток. При помощи переключателя производилось измерения $U_{вх}$ и $U_{вых}$, измеряемое в мВ, на частотах 10, 100, 1000, 10000, 100000 Гц.

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Экспериментальные исследования проводились на базе кафедры биохимии и биофизики Саратовского национального исследовательского государственного университета им. Н.Г. Чернышевского, в период с 2015 по 2017 год.

Постановка эксперимента. Культивирование бактерий проводили в течение 24 часов в присутствии флавоноидов – кверцетина, рутина, нарингина и галловой кислоты – в концентрации 37.5 мкг/мл (опыт) и в среде без добавления флавоноидов (контроль). Клетки осаждали центрифугированием при 10000 g, двукратно отмывали от культуральной жидкости (КЖ) раствором 0.15 М NaCl и проводили измерение импеданса культуры. Так же рассчитывали Кп клеток азоспирилл при воздействии флавоноидов.

Обсуждение результатов исследования. Выбор исследуемых штаммов микроорганизмов обусловлен их распространенностью, хорошей

изученностью, принадлежностью к разным видам и разной стратегией взаимодействия с корнем растения-ассоцианта. Поскольку содержание флавоноидов в почве колеблется в течение года и зависит от множества факторов биотической и абиотической природы, ранее Каневским с соавторами были установлены эффективные концентрации флавоноидов по отношению к азоспириллам. Под «эффективными» понимаются минимальные концентрации флавоноидов, которые обуславливают изменения состава и структуры гликополимеров поверхности азоспирилл, и не вызывают бактериостатического эффекта.

Исследование электрических свойств клеток азоспирилл, выращенных в присутствии флавоноидов. Для *A. brasilense* Sp245 было установлено, что культивирование бактерий в среде с флавоноидами приводило к снижению величины Кп, при этом сопротивление клеток возрастало по сравнению с контролем, начиная с частоты 100 Гц. Снижение Кп составило от 15% для галловой кислоты до 26% для нарингина. При культивировании азоспирилл происходит защелачивание среды, поэтому по изменению этого параметра можно судить о росте культуры. Добавление флавоноидов в среду приводит к снижению показателя защелачивания. Отклонение показателя от контроля не превышало 4%. Это может свидетельствовать о том, что в присутствии флавоноидов происходит незначительное торможение роста культуры.

Аналогичные результаты наблюдались и для штаммов *A. brasilense* Sp7 и

Под действием всех флавоноидов происходило возрастание сопротивления в высокочастотном диапазоне как для *A. brasilense* Sp7, так и для *A. lipoferum* SR65.

Снижение защелачивания КЖ при росте в присутствии флавоноидов наблюдалось для штамма *A. brasilense* Sp7 (до 10% для нарингина по сравнению с контролем), в то время, как изменение данного показателя при

росте *A. lipoferum* SR65 4% по сравнению с контрольной культурой.

Изменение Кп клеток под действием флавоноидов также было максимальным для штамма *A. brasilense* Sp7: под действием нарингина Кп снижался на 20%.

Отдельного внимания заслуживает тот факт, что на штамм *A. lipoferum* SR65 наибольшее влияние оказывал кверцетин в отличие от *A. brasilense* Sp7 и Sp245, для которых максимальное возрастание сопротивления и снижение Кп и величины защелачивания наблюдалось для нарингина. Это позволяет предположить наличие специфичности действия флавоноидов на азоспириллы.

Полученные данные коррелируют с полученными ранее результатами. Было показано, что под влиянием флавоноидов происходит возрастание относительного количества цис-непредельных и предельных жирных кислот в составе мембран. Такие изменения ведут к уплотнению и стабилизации мембран, что неизбежно сказывается на их электропроводности и сопротивлении.

Исследование динамики изменения импеданса клеток азоспирилл, выращенных в присутствии флавоноидов. Поскольку изменение импеданса *A. brasilense* Sp245 и *A. brasilense* Sp7 были схожи, исследования проводились на *A. brasilense* Sp245 и *A. lipoferum* SR65. Эксперимент показал, что нахождение флавоноида кверцетина в среде выращивания обоих штаммов в течение 10 минут приводил к незначительному изменению импеданса клеток, но с увеличением времени культивирования импеданс возрастал и 24-часовое нахождение флавоноида в среде выращивания приводило к резкому повышению сопротивления клеток. Добавление в среду рутин приводило к аналогичным результатам.

Поскольку рутин – более гидрофобное соединение а изменение импеданса клеток в его присутствии происходит с той же интенсивностью, как и в присутствии кверцетина, можно сделать вывод, что сорбция

флавоноидов на поверхности клеток играет незначительную роль в изменении импеданса, возможно. Также, возможно, это происходит из-за невысокой концентрации флавоноида в среде культивирования микроорганизма. Таким образом установлено, что основной вклад в изменение импеданса культуры вносит изменение состава полимеров поверхности клеток и ЖК, входящих в состав мембраны.

Изучение влияния концентрации флавоноидов в среде выращивания на изменение электрических показателей клеток азоспирилл. Поскольку данные, присутствующие в литературе, относительно содержания флавоноидов в почве, корнях растений и ризосфере весьма немногочисленны и порой противоречивы, интерес вызывает исследование влияния разных концентраций флавоноидов на клетки азоспирилл.

Наибольшее влияние на показатель импеданса клеток *A. brasilense* Sp245 оказывал кверцетин в концентрации 600 мкг/мл. Значение импеданса на высоких частотах превышало контрольное в 1,7 раз, что свидетельствует о существенных изменениях в мембране. Данные результаты можно объяснить тем, что в силу гидрофобности и большой концентрации кверцетин активно сорбируется на мембране. Кверцетин и галловая кислота обладают высокой биологической активностью, в том числе и бактериостатической. Резкое возрастание сопротивления можно объяснить также и тем, что присутствие в среде выращивания флавоноидов стимулирует клетку к стабилизации мембраны, чтобы предотвратить проникновение флавоноидов внутрь.

При этом K_p снижается с повышением концентрации флавоноида и при 600 мкг/мл достигает своего минимума — 2,06113. Это говорит о снижении жизнеспособности клеток, что также подтверждается снижением показателя зацелачивания.

Изменение величины импеданса клеток, выращенных в присутствии нарингина и рутина было меньшим, что может быть обусловлено их гликозилированием и снижением гидрофобности. Кп так же снижается при повышении концентрации, но даже при максимальных концентрациях нарингина и рутина снижается не так сильно, как в случае с кверцетином — 2,281481 и 2,301324 соответственно.

Галловая кислота приводила к изменениям импеданса. При этом наибольшую активность проявляла самая высокая концентрация флавоноида. Измерения КП тем временем показали, что при минимальной концентрации галловой кислоты произошло повышение Кп относительно контроля — 5,046643 против 3,419223, а затем, с повышением концентрации флавоноида, происходило снижение Кп.

Под влиянием кверцетина, рутина, нарингина и галловой кислоты наблюдалось снижение значений импеданса клеток *A. lipoferum SR65* с повышением концентрации флавоноидов. Однако, судя по изменению Кп галловая кислота приводила к возрастанию данного показателя. Вместе с результатами рН-метрии это может свидетельствовать о стимулирующем эффекте галловой кислоты в низких концентрациях (2.34 и 9.375 мкг/мл) на оба исследуемых штамма азоспирилл.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Исследование электропроводности биомассы бактерий позволяет получить информацию о состоянии мембран клеток, находящихся под влиянием различных условий. На основании проведённых экспериментов можно сделать предположение, что действие флавоноидов на электрические показатели клеток носит штаммоспецифический характер. Разные штаммы по-разному реагируют на присутствие в среде флавоноидов. Так наибольшие изменения импеданса клеток *A. brasilense* Sp245 и Sp7 происходят под действием кверцетина, а *A. lipoferum* SR65 – нарингина. Данная картина наблюдается при культивировании бактерий в присутствии эффективных концентраций флавоноидов.

Флавоноиды постоянно присутствуют в почве и ризосферные микроорганизмы постоянно подвергаются их действию. Очень высокие концентрации флавоноидов приводят к торможению роста культуры вплоть до полной остановки в присутствии высоких концентраций. Об этом свидетельствуют результаты исследования рН-метрии и электрических показателей клеток азоспирилл. При высоких концентрациях флавоноидов замедляется рост, о чём говорит более слабое защелачивание среды, а также резкое повышение сопротивления. Клетка «перекрывает» связь с внешней средой и стабилизирует мембрану, чтобы не дать флавоноидам проникнуть внутрь.

Однако малые концентрации галловой кислоты оказывают рост стимулирующий эффект на клетки азоспирилл: возрастает защелачивание среды и снижается сопротивление, что говорит об активизации процессов обмена клетки с окружающей средой.

Установлено, что при нахождении культуры клеток в присутствии эффективной концентрации флавоноидов в течение короткого времени (до 1 часа) не приводит к существенному изменению импеданса клеток. Данная ситуация наблюдалась для всех описанных в работе штаммах. Это свидетельствует о том, что вклад сорбции флавоноидов на поверхности

клеток и взаимодействия с клеточными мембранами в возрастание импеданса невелик.